



Title	ゲノム編集技術を用いた新規プロテインキナーゼの軟骨細胞分化における役割解明
Author(s)	萩野, 弘将
Citation	平成27年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2016
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/54688
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

平成 27 年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏 名	はぎの ひろまさ 萩野 弘将	学部 学科	歯	学年	4 年
ふりがな 共 同 研究者名	ごとう まほ ながた なみき 後藤 満帆 長田 奈幹	学部 学科	歯	学年	4 年
	もり ゆみこ 森 裕美子		歯		4 年
アドバイザー教員 氏名	たかはた よしふみ 高畑 佳史	所属	歯学研究科 生化学教室		
研究課題名	ゲノム編集技術を用いた新規プロテインキナーゼの軟骨細胞分化における役割解明				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。				

【研究目的】

生体を構築するまでの発生、成長段階、および生命活動において遭遇する損傷や病態による組織欠損の修復には、体性幹細胞が重要な役割を果たしている。未分化間葉系幹細胞は、自己複製能とともに、骨、軟骨、脂肪、骨格筋、腱・靱帯といった間葉系組織の構成細胞への多分化能を有し、生物学的にも歯科医学的にも非常にユニークな細胞である。

骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋芽細胞は共通の未分化間葉系細胞から分化していくことが予想されていたが、この分化過程のメカニズムを遺伝子レベルで明らかにしたのは筋芽細胞が始まりだった。1987 年に MyoD が発見され basic helix-loop-helix (bHLH) 型の転写因子が、未分化間葉系幹細胞から筋管までの分化を支配することが示された。1994 年になって脂肪細胞への分化を支配する転写因子として核内受容体の一つ peroxisome proliferator-activated receptor2 (PPAR γ 2) が同定された。そして 1997 年、ショウジョウバエの体節形成遺伝子の一つ runt にホモロジーを持つ runt-related transcription factor2 (Runx2) が骨芽細胞の分化を支配する遺伝子の一つとして登場した (Komori et al *Cell*. 1997)。さらに 1999 年に、軟骨細胞への分化に high mobility group (HMG) の転写因子 Sox9 が必須であることが示された (Bi et al *Nat Genet*. 1999)。このように、未分化間葉系幹細胞から各種骨格系形成細胞への分化は全く異なるファミリーに属する転写因子によって支配されており、これら転写因子が各細胞特異的遺伝子の発現を調節することが知られている。転写因子の発現や、その転写活性を制御するものとして骨形成因子 BMP や FGF、Wnt シグナルなど様々な因子やその調節機構の解明が近年めざましく進展を遂げている (Chen et al *Front Biosci*. 2004)。

未分化間葉系幹細胞の分化調節機構を理解するために、未分化間葉系幹細胞であるマウス肢芽細胞に BMP2 処理を行い、Microarray 解析を実施し、発現変動する遺伝子を網羅的に探索した。その結果に基づいて、BMP2 刺激により顕著に発現上昇する新規プロテインキナーゼであ

る **Stk32a** 遺伝子に着目し、「**Stk32a** 遺伝子が軟骨細胞分化に関与する」という研究テーマを着想した。

上記の研究テーマを遂行するため、3年次の基礎配属実習において、最新のゲノム編集技術である **CRISPR/Cas9** 法を用いて、**Stk32a** 遺伝子を欠損する細胞クローンを樹立した。今回の奨励事業では、軟骨細胞マーカー遺伝子の発現を指標に、作成した **Stk32a** 欠損細胞株を、野生型の細胞株と比較検討し、軟骨細胞分化過程における **Stk32a** の関与を明らかにすることとした。

本研究の特色の一つであるゲノム編集技術を用いた遺伝子ノックアウト法は、短期間で目的遺伝子の機能解析を行うことのできる画期的な研究手法である。本研究により、軟骨細胞分化の新たなメカニズムが明らかになり、学術的に大きな知見を見出すと期待される。また **Stk32a** 遺伝子は間葉系幹細胞の分化決定シグナルに関与する可能性を含有しており、再生医学ならびに再生医療への波及効果も期待できる。さらに **Stk32a** は、一次構造解析からセリン・スレオニンキナーゼであるが、その機能的役割は全く不明であるので、本研究で得られる結果は、他の細胞系列の分化あるいは増殖の理解にも寄与すると見込まれる。

【研究計画・方法】

軟骨細胞分化過程における新規プロテインキナーゼ **Yank1** の役割解明へ向けた基盤的研究を実施するために、基礎配属実習時において作成した **Yank1** 欠損細胞株を用いて、下記の実験計画を実施した。

1: マウス肢芽細胞に対する **BMP2** 刺激応答性の検討

マウス肢芽細胞ならびに **C3H10T1/2** 細胞に **BMP2** 処理を行い、**Total RNA** を抽出し、逆転写反応により **cDNA** を合成後、**RT-qPCR** 法にて **Yank1** 遺伝子発現への効果を確認する。また、軟骨細胞および骨芽細胞のマーカー遺伝子である **Runx2**, **Osterix**, **ALP**, **Sox9** ならびに **Col2a1** の発現を **RT-qPCR** 法によって定量した。以上の実験より、**Microarray** 解析によってクローニングされた **Yank1** 遺伝子の発現変動と軟骨細胞および骨芽細胞分化との関係を明らかにしようと考えた。

2: **Yank1** 欠損細胞株 **C3H10T1/2** の軟骨細胞分化能に対する解析

Yank1 欠損細胞株と野生型細胞株を、それぞれ軟骨細胞あるいは骨芽細胞分化誘導培地にて5日間培養後、軟骨細胞および骨芽細胞のマーカーである **ALP** 活性を測定し、軟骨細胞分化ならびに骨芽細胞分化に対する **YANK1** の機能的役割を検討した。

さらにそれぞれの細胞株を **BMP2** にて24時間、刺激し、**Total RNA** を回収後、軟骨細胞および骨芽細胞の分化マーカー遺伝子を **RT-qPCR** 法により検索し、軟骨細胞分化ならびに骨芽細胞分化に対する **YANK1** の機能的役割を行った。

3: **Yank1** 欠損細胞株 **C3H10T1/2** およびマウス肢芽細胞に対する **Yank1** 過剰発現系の構築

上記2の課題で得られる実験結果を多角的かつ複眼的に検討するために、**Yank1** 欠損細胞株にレトロウィルスを用いて **Yank1** 遺伝子を導入し、レスキュー実験を実施する。**YANK1** 遺伝

子の導入により、軟骨細胞ならびに骨芽細胞のマーカー遺伝子の BMP2 応答性が回復するか否かを、RT-qPCR 法にて検索した。また、Alcian Blue 染色による軟骨細胞外基質を指標とした解析も合わせて実施した。

さらにマウス肢芽細胞および C3H10T1/2 細胞に Yank1 を過剰発現させ、軟骨細胞分化に対する効果を RT-qPCR 法ならびに Alcian Blue 染色にて解析した。

【研究経過】

1: マウス肢芽細胞に対する BMP2 刺激応答性の検討

胎生 13.5 日齢のマウスから肢芽細胞を単離し単層条件で培養を行った。BMP2 を 24 時間処理した後、total RNA を抽出し、Stk32a, Osterix, ALP, Sox9 および Runx2 を特異的に認識するプローブを用いて RT-qPCR 法により各遺伝子を定量した。その結果 BMP2 の刺激によって Stk32a, Osterix, ALP, Sox9 の発現は著明に上昇したが、Runx2 の発現誘導は認められなかった。(図 1)

2: WT 細胞株および#9 細胞株の分化能に対する検討

(A) WT 細胞株および#9 細胞株をそれぞれ BMP2 により 24 時間処理した後、Total RNA を抽出した。次に Osterix, ALP, Sox9, Runx2 を特異的に認識するプローブを用いて、RT-qPCR 法により各遺伝子を定量した。

その結果、WT 細胞株では BMP2 刺激によって、Osterix, ALP, Sox9 の発現誘導が確認されたのに対して、#9 細胞株では Sox9 の発現誘導が認められたが、ALP, Osterix の発現誘導は認められなかった。図 2 【A】

(B) WT 細胞株及び#9 細胞株を 50 μ g/ml ascorbic acid, 5mM β -glycerophosphate を含む培地で 5 日間培養を行い、ALP 染色を行った。その結果、WT 細胞株では、ALP による染色が観察されたが、#9 細胞株では ALP による染色は認められなかった。図 2 【B】

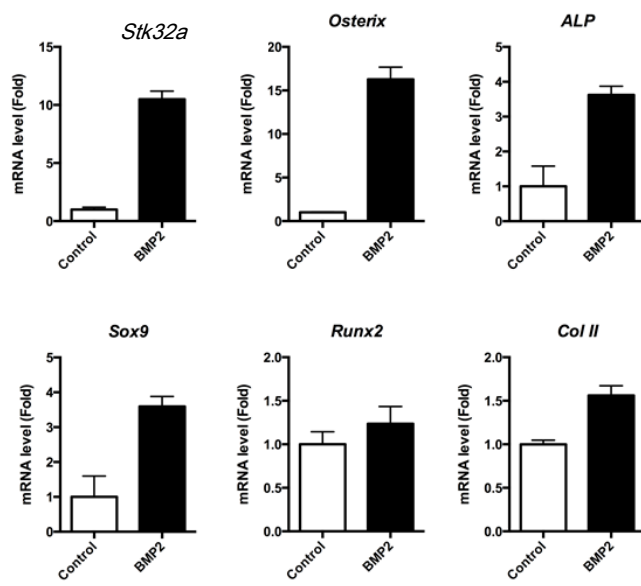


図 1 BMP 2 刺激応答性の検討結果

肢芽細胞に BMP 2 を刺激することで Stk32a の発現が上昇した。

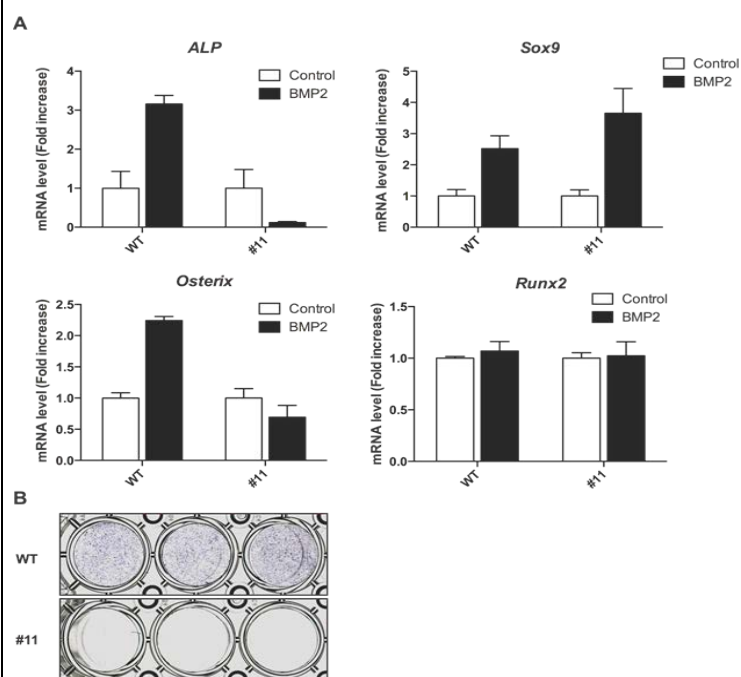


図 2

【A】WT、標的遺伝子 KO 細胞（#11）の比較

KO 細胞では BMP 刺激により ALP・Osterix の発現量が減少した。

【B】WT、標的遺伝子 KO 細胞（#11）の ALP 染色

#11 では ALP の染色性は観察されなかった。

【結論・考察】

- ゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 法を用いて、C3H10T1/2 細胞における Stk32a 遺伝子欠損細胞株を作成した。
- WT 細胞株に BMP2 を 24 時間作用させると、Osterix,ALP および Sox9 の発現が有意に上昇した。一方 KO 株では Sox9 の発現が誘導されたが、ALP ならびに Osterix の発現誘導は認められなかった。
- 2.より新規プロテインキナーゼ Stk32a は BMP2 のシグナル制御に関与し、間葉系幹細胞の分化決定を調節する可能性が示唆された。今後は Stk32a と BMP2 シグナルについてより詳細な解析を検討したい。

参考文献リスト

Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., et al. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89(5), 755–764.

Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., & de Crombrughe, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genetics*, 22(1), 85–89.

Chen, D., Zhao, M., Harris, S. E., & Mi, Z. (2004). Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Frontiers in Bioscience*, 9, 349–358.